

**VERGLEICH DER LIPOLYTISCHEN WIRKUNG
VON L- UND D-TRIJODTHYRONIN
AUF ISOLIERTE FETTZELLEN DER RATTE;
LIPOLYSE ISOLIERTER RATTENFETTZELLEN
IM MENSCHLICHEN SERUM**

Mechtild Hegnauer

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. E. Buchborn

VERGLEICH DER LIPOLYTISCHEN WIRKUNG
VON L- UND D-TRIJODTHYRONIN
AUF ISOLIERTE FETTZELLEN DER RATTE;
LIPOLYSE ISOLierter RATTENFETTZELLEN
IM MENSCHLICHEN SERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Mechtild Hegnauer
aus München

1975

Berichterstatter:

Professor Dr. K. Schwarz

Mitberichterstatter:

Professor Dr. E. Buchborn

Dekan:

Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Januar 1976



INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Die Bedeutung der Geschichte	2
III.	Die Bedeutung der Geschichte für die Gegenwart	3
IV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Zukunft	4
V.	Die Bedeutung der Geschichte für die Wissenschaft	5
VI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Kunst	6
VII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Politik	7
VIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Religion	8
IX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Philosophie	9
X.	Die Bedeutung der Geschichte für die Pädagogik	10
XI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Medizin	11
XII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Naturwissenschaften	12
XIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Sozialwissenschaften	13
XIV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Wirtschaftswissenschaften	14
XV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Rechtswissenschaften	15
XVI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Linguistik	16
XVII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Musikwissenschaft	17
XVIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Theaterwissenschaft	18
XIX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Filmwissenschaft	19
XX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Medienwissenschaft	20
XXI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Informationswissenschaft	21
XXII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Kommunikationswissenschaft	22
XXIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Kulturwissenschaft	23
XXIV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	24
XXV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	25
XXVI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	26
XXVII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	27
XXVIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	28
XXIX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	29
XXX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	30
XXXI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	31
XXXII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	32
XXXIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	33
XXXIV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	34
XXXV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	35
XXXVI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	36
XXXVII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	37
XXXVIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	38
XXXIX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	39
XL.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	40
XLI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	41
XLII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	42
XLIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	43
XLIV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	44
XLV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	45
XLVI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	46
XLVII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	47
XLVIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	48
XLIX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	49
L.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	50
LI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	51
LII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	52
LIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	53
LIV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	54
LV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	55
LVI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	56
LVII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	57
LVIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	58
LIX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	59
LX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	60
LXI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	61
LXII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	62
LXIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	63
LXIV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	64
LXV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	65
LXVI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	66
LXVII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	67
LXVIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	68
LXIX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	69
LXX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	70
LXXI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	71
LXXII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	72
LXXIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	73
LXXIV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	74
LXXV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	75
LXXVI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	76
LXXVII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	77
LXXVIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	78
LXXIX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	79
LXXX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	80
LXXXI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	81
LXXXII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	82
LXXXIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	83
LXXXIV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	84
LXXXV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	85
LXXXVI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	86
LXXXVII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	87
LXXXVIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	88
LXXXIX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	89
LXXXX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	90
LXXXXI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	91
LXXXXII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	92
LXXXXIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	93
LXXXXIV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	94
LXXXXV.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	95
LXXXXVI.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	96
LXXXXVII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	97
LXXXXVIII.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	98
LXXXXIX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	99
LXXXXX.	Die Bedeutung der Geschichte für die Geschichtswissenschaft	100

MEINEM SOHN THOMAS

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methodik	4
II.1. Präparation isolierter Rattenfettzellen	4
II.2. Herstellung der Hormonverdünnungen	5
a) Insulin	5
b) T_3 und T_4	6
c) Adrenalin	6
II.3. Isolation der DNS aus den isolierten Fettzellen	7
II.4. Bestimmung der DNS-Konzentration	9
II.5. Bestimmung des freien Glycerins im Inkubationsmedium	11
II.6. Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum	13
II.7. Versuchsablauf mit Inkubation isolierter Rattenfettzellen im Albuminpuffer	14
II.8. Versuchsablauf mit Inkubation isolierter Rattenfettzellen im Serum	15
III. Ergebnisse	17
III.1. Auswertung der Meßergebnisse	17
III.2. Lipolyse isolierter Rattenfettzellen unter dem Einfluß von	18
A) LT_3	18

B) DT_3	19
C) Adrenalin	21
D) LT_4 und DT_4	23
III.3. Vergleich der Wirkungen von LT_3 und DT_3	24
III.4. Dosis-Wirkungskurven für LT_3 und Adrenalin	25
III.5. Lipolyse isolierter Rattenfettzellen im Serum	27
IV. Diskussion	30
IV.1. Versuchsablauf	30
IV.2. Die lipolytischen Hormone (Adrenalin und Trijodthyronin)	32
IV.3. Das antilipolytische Hormon Insulin	36
IV.4. Vergleich LT_3 - DT_3	39
IV.5. Seruminkubation	41
V. Zusammenfassung	44

Literaturverzeichnis

Lebenslauf

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

SDH	Schilddrüsenhormone
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
SSC-Puffer	Sodium-Saline-Citratpuffer
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
DPN	Diphosphopyridin-Nucleotid
AK	Antikörper
Vp(n)	Versuchsperson(en)
HGH	Wachstumshormon
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
LH	Luteinisiertes Hormon
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
NA	Noradrenalin
TG	Triglyceride
PHLA	Lipoproteinlipase-Aktivität im Postheparin- Plasma
DBcAMP	Dibutyryl-cyclo-AMP

I. EINLEITUNG

Die Masse des Fettgewebes beträgt beim normalgewichtigen Menschen ca. 20 - 40 % des Körpergewichts. Es dient dem Körper als Energiereservoir, zum Schutz gegen Kälte und mechanische Traumen und ist ein integrierter Bestandteil des Stoffwechselgeschehens im gesamten Organismus. Die Synthese von Fett stellt quantitativ den größten Anteil im Metabolismus der Kohlenhydrate dar; 30 - 40 % der aufgenommenen Glucose werden in freie Fettsäuren und Glycerin umgewandelt und als Triglyceride im Fettgewebe gespeichert. Die unveresterten Fettsäuren dienen als bedeutender Energielieferant für viele Organe. Freisetzung und Aufnahme von freien Fettsäuren durch das Fettgewebe werden über Lipasen gesteuert, die hormonal und nervös aktiviert werden.

Zur Gruppe derjenigen Hormone, welche die Hydrolyse von Triglyceriden fördern, zählen außer den Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin u. a. auch die endogen freigesetzten Schilddrüsenhormone L-Thyroxin und L-Trijodthyronin. Die lipolytische Wirkung und der serumlipidasenkende Effekt der SDH wird seit einigen Jahren erfolgreich zur Unterstützung der Therapie der Fettsucht bei Reduktionsdiäten eingesetzt. Problematisch wird ihre Anwendung durch die unerwünschten Nebenwirkungen, die bei zu hoher Dosierung auftreten und im Extremfall das Bild einer Thy-

reotoxicosis factitia hervorrufen können. (HOLLINGSWORTH 1970)

Eine Reihe von Autoren hat aufgrund klinischer Langzeitstudien die serumlipidsenkende Wirkung von DT_3 und DT_4 -den optischen Antipoden der physiologischen SDH- und anderen SDH-Analoga beschrieben. (SCHWARZ und HUHNSTOCK 1964, MEYER 1970, DANOWSKI et al. 1971, KOSCHINSKY et al. 1974) Sie beobachteten einen guten Effekt von DT_3 und DT_4 auf die Senkung der Serumspiegel von Cholesterin, Triglyceriden und Phospholipiden. Da hochgereinigte Präparate von DT_3 und DT_4 , im Gegensatz zu den L-Isomeren, keine störenden Nebenwirkungen wie Erhöhung der Pulsfrequenz, Schwitzen, Tremor oder Angina pectoris-Anfälle hervorrufen, scheinen sie ein ideales Mittel zur Therapie der Hyperlipidämie und damit Prävention von Arteriosklerose, koronaren, zerebralen und peripheren Durchblutungsstörungen darzustellen. Ein zusätzlicher lipolytischer Effekt dieser Präparate würde es ermöglichen, ohne unerwünschte Wirkungen durch hochdosierte Applikation die Gewichtsreduktion adipöser Patienten zu beschleunigen und gleichzeitig deren Lipidspiegel im Serum drastisch zu senken.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von DT_3 und DT_4 auf die Lipolyse isolierter Rattenfettzellen bei verschiedenen Insulinkonzentrationen untersucht. Als Vergleich wurden bei jedem Experiment die basale sowie die

durch LT_3 , LT_4 und Adrenalin stimulierte Lipolyse gemessen. Schließlich bestimmten wir noch die Glycerinfreisetzung der Fettzellen im Serum von Normalgewichtigen, Adipösen und Patienten, die unter Null-Diät standen. Durch diese Versuche sollte die Übertragbarkeit der durch Inkubation im Albuminpuffer mit zugegebenen Hormonen erhaltenen Werte auf physiologische Bedingungen überprüft werden.

II. MATERIAL UND METHODIK

II.1. Präparation isolierter Rattenfettzellen

Für die vorliegenden Versuche wurde der Nebenhoden-Fettgewebsanhang männlicher Ratten vom Stamm Whistar II verwendet. Das Gewicht der Tiere betrug zum Zeitpunkt des Versuchs 120 ± 20 g, nachdem diese mindestens drei Tage vorher unter gleichen Bedingungen bei einer kohlehydratreichen Standardnahrung gehalten worden waren. Zur Entnahme des Fettgewebes wurden die Tiere durch einen Schlag auf den Kopf betäubt und dekapitiert; anschließend wurde die Bauchhöhle eröffnet, der Fettgewebsanhang vom Nebenhoden entnommen und in das vorbereitete Plastikgefäß mit Schraubdeckel gebracht. In dem Gefäß befand sich eine Kollagenase-Lösung, die eine Konzentration von 500 mg % Kollagenase, gelöst in Krebs-Ringer-Puffer mit einem Gehalt von 2 g % Rinder-Albumin und 10 mg % Glucose, enthielt.

Dieses von RAFFEL (1964) beschriebene Verfahren zur Isolierung von Fettzellen macht sich die Tatsache zunutze, daß die Zellen im Fettgewebe durch kollagenhaltiges Bindegewebe verbunden sind, welches durch Kollagenase leicht aufgelöst werden kann. Diese Auflösung war nach 90minütigem Schütteln im Köttermann bei 37° C erreicht. Die vollständi-

ge Trennung der Fettzellen von Bindegewebe sowie Kapillaren erfolgte durch kurzfristiges Zentrifugieren bei ca. 700 U/min. Die aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Gefäßes befindlichen Bindegewebs- und Gefäßzellen wurden mit einer Plastikspritze zusammen mit dem Kollagenasehaltigen Albuminpuffer entfernt. Die verbleibende Fettzellschicht wurde mit ca. 6 - 8 ml Albuminpuffer von 37° C aufgefüllt, geschüttelt und erneut zentrifugiert. Diese Prozedur des Waschens wurde insgesamt dreimal ausgeführt und die zuletzt erhaltene Fettzellmenge mit Albuminpuffer auf das für die Anzahl der Ansätze erforderliche Volumen gebracht. Die in dieser Suspension enthaltenen Fettzellen konnten durch kurzes Aufschütteln im Medium gleichmäßig verteilt werden, und damit war die Zugabe gleicher Mengen von Zellen in jedes Reaktionsgefäß gewährleistet.

II.2. Herstellung der Hormonverdünnungen

a) Insulin

Kristallines Insulin wurde in 1/200 N HCl gelöst; die so erhaltene Stammlösung hatte eine Konzentration von 10 IE Insulin/ml. Die weitere Verdünnung erfolgte mit einem Gelatinepuffer bis zum 75fachen der gewünschten Endkonzentrationen. Je ein Teil der Lösung + 24 Teile Albuminpuffer - also dreifache Konzentration - wurde nun in Poly-

styrolröhrchen abgefüllt und bei -17° C aufgehoben.

b) T_3 und T_4

Die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 sind bei pH 7 nahezu unlöslich; dies gilt sowohl für die rechts- wie für die linksdrehende Form der beiden Substanzen. Die L-Konfigurationen lagen uns als Na^{+} -Salze vor, die D-Konfigurationen in Form von D-Trijodthyronin-Betain bzw. D-Thyroxin-Betain (Diese Präparate wurden uns freundlicherweise von der Firma Merck zur Verfügung gestellt). Um eine Lösung dieser Substanzen im Albuminpuffer zu erreichen, mußten wir die kristalline Substanz zunächst in 0,1 N Natronlauge lösen. Darauf folgte Verdünnung mit aqua bidest. 1:10. Die zum Erreichen der Endkonzentration von $15 \cdot 10^{-6}$ Mol/l - für T_3 - bzw. $75 \cdot 10^{-6}$ Mol/l (T_4) erforderliche Menge dieser Stammlösung wurde nun in den Albuminpuffer gebracht. So konnte eine vollständige Lösung der Hormone im Inkubationsmedium bei physiologischem pH erzielt werden.

c) Adrenalin

Analog der Lösung von T_3 und T_4 wurde die Adrenalin-Verdünnung hergestellt. Das kristalline Adrenalin löst sich nur bei saurem pH, weshalb wir die Lösung in $\frac{1}{200}$ N Salzsäure vornahmen, um durch Weiterverdünnung mit Albuminpuffer schließlich die erwünschte Konzentration zu erreichen. Die aus den oben geschilderten Präparationen erhaltenen Hormonlösungen wurden für jeweils fünf Versuche im Voraus angesetzt und bei -17° C aufbewahrt. Es zeigte sich

kein Nachlassen der biologischen Wirksamkeit bei Aufbewahrungsfristen bis zu 14 Tagen.

II.3. Isolation der DNS aus den isolierten Fettzellen

Die Isolation der DNS aus der Fettzell suspension wurde nach der von J. MARMUR (1961, 1963) beschriebenen Methode vorgenommen. Diese Methode hat sich für unsere Zwecke als sinnvoll erwiesen, da sie mit einfachen Mitteln durchzuführen ist und die vorhandene DNS-Menge dadurch praktisch quantitativ zur Bestimmung überführt werden kann.

Die nach dem Beschicken aller Reaktionsgefäße übrige Menge an Fettzellsuspension wurde in Einzelportionen von je 2 ml aufgeteilt. Es konnten für jeden Versuch mindestens zwei Proben von DNS isoliert und bestimmt werden.

Es hat sich gezeigt, daß die in 2 ml enthaltene DNS-Menge bei der nachfolgenden kolorimetrischen Bestimmung im Bereich optimaler Empfindlichkeit lag.

Zunächst wurde das Suspensionsmedium durch vorsichtiges Zentrifugieren von den Fettzellen getrennt und anschließend mit einer Plastikkanüle abgesaugt. Die im Glas verbliebene Fettzellschicht wurde nun mit Saline-EDTA auf 3 ml aufgefüllt. Diese wässrige Lösung von NaCl und EDTA wurde hier wegen ihrer DNase-inaktivierenden Wirkung als

Suspensionsmedium verwendet. Zur Zerstörung der Zellen wurden 0,2 ml Na-lauryl-sulfat zugegeben, welches als anionisches Detergens die meisten Zellen auflöst sowie die Enzym-Aktivität verhindert und Proteine denaturiert. Zusammen mit der anschließenden Zentrifugation bei 3500 U/min konnte eine vollständige Lysis der Zellen sowohl auf chemischem wie auf mechanischem Weg erreicht werden. Die Auflösung der Zellen wurde durch 10minütiges Erhitzen im Wasserbad auf 60° C unterstützt.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden 0,8 ml einer 5 M Natriumperchloratlösung sowie 4 ml Chloroform-Isoamylalkohol (Mischverhältnis 24 : 1) hinzupipettiert. Die hohe Salzkonzentration der Na-perchlorat-Lösung bewirkt dabei die Dissoziation von Proteinen und Nukleinsäuren; durch das Chloroform werden die Proteine denaturiert und aus der wässrigen Phase extrahiert. Isoamylalkohol reduziert die durch Na-laurylsulfat hervorgerufene Schaumbildung, unterstützt die Trennung der Nukleinsäuren von Proteinen und stabilisiert die Schichten der nach 20minütigem dreidimensionalen Schütteln zentrifugierten enteiweißten Lösung.

Die oberste, wässrige Phase enthält die gelösten Nukleinsäuren und wurde nach vorsichtigem Abpipettieren in ein Glasröhrchen mit 10 - 15 ml konz. Äthylalkohol aufgefüllt. Durch vorsichtiges Mischen der beiden Phasen wurden die Nukleinsäuren ausfällt und konnten so bis zur Bestim-

nung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

II.4. Bestimmung der DNS-Konzentration

Im Anschluß an dieses Verfahren zur Isolation der DNS bestimmten wir die DNS-Konzentration mittels der 1929 erstmals von Z. DISCHE beschriebenen und von GRIOTTI (1952) modifizierten Farbreaktion mit Indol und konzentrierter Salzsäure. Wir arbeiteten nach dieser Bestimmungsmethode, da die vorliegenden DNS-Konzentrationen in dem Bereich lagen, für den diese beschrieben ist und wegen der hohen Spezifität dieser Reaktion: lediglich Arabinose und andere Pentosen sowie RNS produzieren eine braune Farbe in der Wasserphase, welche durch Chloroform nicht extrahiert werden kann, deren Intensität jedoch nur 8 % der von gleichen Mengen DNS erzeugten entspricht. Die Extraktion störender Reaktionsprodukte mit Chloroform stellt praktisch eine Weiterführung der Entweißung aus der Isolationsprozedur dar.

Die mit Äthylalkohol ausgefällten Nukleinsäuren wurden zunächst zentrifugiert, der Alkohol abgegossen und der Bodensatz getrocknet. Das so erhaltene DNS-Pulver wurde in verdünntem Natrium-Saline-Citrat-Puffer (SSC) gelöst und mit konzentriertem SSC-Puffer zur erwünschten Konzentration von 0,15 Mol/l NaCl bzw. 0,015 Mol/l Na-Citrat aufgefüllt. Dieses etwas umständliche Verfahren ist

nötig, da die DNS mit dem bereits in der erforderlichen Konzentration vorliegenden SSC-Puffer nicht aufgelöst werden kann. Gleichzeitig wurde für jede DNS-Bestimmung eine Eichkurve aufgestellt. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe von $10 \mu\text{g DNS/ml}$ bis $0,3125 \mu\text{g DNS/ml}$ in SSC-Puffer der gleichen Konzentration hergestellt. Zu jeder dieser 1 ml enthaltenden Proben wurden nun 0,5 ml 0,04 %iger wässriger Indollösung sowie 0,5 ml rauchender Salzsäure hinzupipettiert, die Flüssigkeiten durch kurzes Schütteln gut vermischt und im kochenden Wasserbad 10 Minuten lang erhitzt. Dadurch entstand eine mehr oder weniger intensive rötlich-braune Verfärbung der Proben, die bei der isolierten DNS wesentlich stärker war, als bei den für die Eichkurve hergestellten Standardverdünnungen. Diese starke Anfärbung ist bedingt durch die Beimengung von Hexosen und anderen Verunreinigungen und verschwindet nach der Extraktion dieser Substanzen durch Chloroform. Zu jeder Probe wurden nach dem Abkühlen 2,5 ml Chloroform gegeben, die Gläser einzeln gut durchgeschüttelt und durch Zentrifugieren die wässrige von der Chloroformphase getrennt. Die wässrige Phase war nun vorsichtig - und möglichst vollständig - abzupipettieren und die Prozedur des Auswaschens mit Chloroform noch 2mal zu wiederholen. Nach dreimaliger Extraktion zeigte die Chloroformphase keinerlei Verfärbung mehr, sodaß man annehmen konnte, daß die Farbe der wässrigen Phase nun lediglich durch DNS und die oben

erwähnten möglichen Substanzen bedingt war.

Gegen einen in gleicher Weise behandelten Leerwert von SSC-Puffer wurden nun die Extinktionen der Proben in einer Mikrodurchlaufkuvette bei 492 nm im Photometer gemessen. Anhand der gleichzeitig aufgestellten Eichkurve konnte wir die DNS-Konzentrationen im Citratpuffer bestimmen.

Die DNS-Konzentrationen in der Fettzellsuspension errechnet sich wie folgt:

x = DNS-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) im Citratpuffer

y = DNS-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) in Zellsuspension (Endwert)

v = Eingesetztes Volumen Zellsuspension (hier: 2 ml)

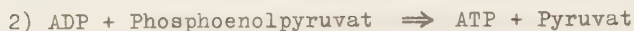
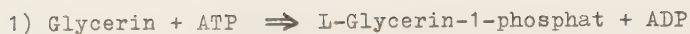
w = Volumen wasserige Phase nach Enteiweißung (hier: 3,5 ml)

$$x = \frac{v \cdot y}{4} \cdot w$$

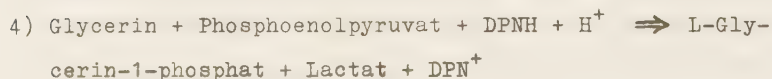
$$x = \frac{7 \cdot y}{4} ; \quad y = \frac{4}{7} \cdot x \quad \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

II.5. Bestimmung des freien Glycerins im Inkubationsmedium

Als Maß für die lipolytische Aktivität der isolierten Fettzellen verwendeten wir die Bestimmung der Glycerinkonzentrationen im Inkubationsmedium nach KREUTZ (1962). Diese enzymatische Methode beruht auf folgenden Reaktionen:



Durch Koppeln der von Glycerokinase (1), Pyruvatkinase (2) und Lactat-Dehydrogenase (3) katalysierten Reaktionen ergibt sich als Summenreaktion:



Gemessen wird die Abnahme von DPNH + H⁺ als Extinktionsänderung bei 334 nm im Eppendorf Photometer.

Der erste Extinktionswert wurde nach Vermischen folgender Lösungen in einer Küvette gemessen: 2,3 ml 0,1 M Triäthanolamin-HCl-Puffer (pH 7,6), 0,2 ml Lösung 2 (enthält DPNH plus H⁺, ATP und PEP), 0,5 ml Serum bzw. von Fettzellen freies Suspensionsmedium und 0,03 ml LDH + PK.

Nach Zugabe von 0,02 ml GK wurde das Ende der Reaktion abgewartet und anschließend E₂ bestimmt.

Berechnung der Konzentration:

$$C = \frac{E \cdot \text{Testvolumen}}{E \cdot \text{Serummenge} \cdot \text{Schichtdicke}} \quad \frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml}}$$

$$C = \frac{E \cdot 3,05}{6,09 \cdot 0,5 \cdot 1}$$

$$C = E \cdot 1,0016 \cdot \mu \text{ Mol/ml}$$

Unter den hier gewählten Bedingungen durfte also die Konzentration an freiem Glycerin mit der Extinktionsdifferenz gleichgesetzt werden.

II.6. Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum

Die Insulinbestimmung erfolgte nach der von HALES und RANDLE (1963) beschriebenen Doppel-Antikörper-Methode im Radio-Immuno-Assay. Diese Methode verwendet einen Insulin-spezifischen Antikörper vom Meerschweinchen. Das Insulin in der zu testenden Flüssigkeit sowie zugegebenes, radioaktiv markiertes Insulin konkurrieren miteinander um die Reaktion mit dem Antikörper. Nach 18stündiger Inkubation mit Kaninchenserum, das gegen den vom Meerschweinchen stammenden Insulin-AK sensibilisiert ist, wird der unlösliche Insulin-AK-AK-Komplex herausgefiltert und die Radioaktivität des Komplexes gemessen. Deren Stärke steht in reziprokem Verhältnis zu der in der Testflüssigkeit anwesenden Insulinmenge. Anhand einer in gleicher Weise erstellten Eichkurve kann nun die der Anzahl der Counts/min entsprechende Insulinkonzentration der jeweiligen Serumprobe abgelesen werden.

II.7. Versuchsablauf mit Inkubation isolierter Rattenfettzellen in Albuminpuffer

Von den isolierten, in Albuminpuffer suspendierten Zellen wurde je 1 ml in vorbereitete Packard-Reaktionsgefäße gebracht. Diese enthielten bereits je 1 ml der Verdünnung der Schilddrüsenhormone in Kombination mit 1 ml Insulinverdünnung von vier verschiedenen Konzentrationen (0, 10, 50 und 100 μ E/ml). Zur Messung der Basallipolyse wurden die Zellen in Albuminpuffer ohne Hormonzusatz inkubiert. Zur Kontrolle der Stoffwechselaktivität der Zellen war Adrenalin, $4 \cdot 10^{-6}$ M zugegeben. Bei der Zubereitung der verschiedenen Lösungen war stets auf die Einhaltung physiologischer pH-Werte zu achten. Dies konnte dadurch gewährleistet werden, daß der allen Lösungen zugrundeliegende Albuminpuffer, dessen pH nach der Herstellung meist zwischen 7, 6 und 8 lag, mit CO_2 auf ein pH von 7,4 gebracht wurde. Die Pufferkapazität war dann ausreichend, um weitere Schwankungen zu vermeiden. Jedes Gefäß enthielt nun 1 ml der Insulinverdünnung, 1 ml Schilddrüsenhormon (bzw. Adrenalin oder Puffer) und 1 ml Fettzellsuspension, wurde mit einem Schraubdeckel verschlossen und 90 min bei 37°C im Köttermann-Schüttler inkubiert. Während dieser Zeit konnte die Isolierung der DNS aus der übrigen Fettzellsuspension durchgeführt werden. Nach Ablauf der $1\frac{1}{2}$ -stündigen Inkubationszeit wurde der

Inhalt eines jeden Packard-Gefäßes in ein kleines Polystyrol-Röhrchen gegossen, und nachdem sich die Zellen an der Oberfläche der Flüssigkeit abgesetzt hatten, konnte der klare Puffer mit einer Plastikspritze abgesaugt werden. Aus diesem wurde dann das Glycerin als Maß für die lipolytische Aktivität der Zellen bestimmt.

In gleicher Weise wurden die Versuche zur Aufstellung einer Dosis-Wirkungskurve für Adrenalin und LT_3 durchgeführt.

II. 8. Versuchsablauf mit Inkubation isolierter Rattenfettzellen im Serum

Für diese Versuchsreihe wurden 3 Gruppen von Versuchspersonen gebildet:

- 1) Normalkollektiv
- 2) Adipöse, die normale Kost erhielten
- 3) Adipöse während einer Nulldiät

Jeweils nach dem Frühstück wurde den Versuchspersonen ca. 20 ml Venenblut entnommen, welches nach etwa $\frac{1}{2}$ Stunde zur Serumgewinnung zentrifugiert wurde. Davon wurden sofort 1 bis 2 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt, und diese bis zur Insulinbestimmung tiefgekühlt aufbewahrt.

Zur Messung der Lipolyse wurden die Versuche wie unter II.7. beschrieben ausgeführt. Von jedem Serum wurden

vier verschiedene Ansätze hergestellt:

1		1 ml Serum 1 ml Fettzellsuspension	} mit 4×10^{-6} Mol/l Adrenalin
2		1 ml Serum - Albuminpuffer 1:1 1 ml Fettzellsuspension	
3		1 ml Serum 1 ml Fettzellsuspension	
4		1 ml Serum - Albuminpuffer 1:1 1 ml Fettzellsuspension	

Abb. 1: Ansätze zur Inkubation isolierter Fettzellen
der Ratte im menschlichen Serum

Außerdem wurde bei jedem Versuch die basale Lipolyse sowie die Lipolyse in Albuminpuffer mit $4 \cdot 10^{-6}$ M Adrenalin bestimmt. Da als Maß für die lipolytische Aktivität der Zellen nur das freigesetzte Glycerin gelten kann, wurde der Glyceringehalt aller Seren bestimmt, und der jeweilige Anteil von der Glycerinkonzentration im Inkubationsmedium abgezogen.

III. ERGEBNISSE

III.1. A u s w e r t u n g d e r M e s s e r g e b - n i s s e

Die im folgenden Abschnitt angegebenen Daten stellen Mittelwerte der Meßwerte aus der jeweiligen Anzahl von durchgeführten Versuchen dar. Bei allen Versuchen wurden je zwei Ansätze gleichen Inhalts inkubiert, und die Bestimmung der Glycerinkonzentration im Inkubationsmedium doppelt durchgeführt. Für jeden Versuch wurde ein Durchschnittswert aus vier Einzelbestimmungen gebildet ("n" bezieht sich auf die Zahl der ausgeführten Experimente). Bei unseren Versuchen wurde die Zufallsvariable (hier: Glycerinfreisetzung) für jeden Probanden (hier: Fettzellpräparation eines Versuches) unter verschiedenen Bedingungen (A ohne oder B mit SDH- bzw. Adrenalinzusatz) bestimmt. Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob die Bedingungen A und B unterschiedlichen Einfluß auf die Größe der Zufallsvariablen ausüben, muß geprüft werden, ob sich der Mittelwert der Differenzen zufällig oder signifikant von Null unterscheidet. Um dies zu ermitteln, wurden die Meßergebnisse nach dem t-Test für korrelierende Stichproben ausgewertet.

III.2. Lipolyse isolierter Rattenfettzellen unter dem Einfluß von

A) LT_3

In Abb. 2 sind die Glycerinkonzentrationen für die basale und die mit LT_3 stimulierte Lipolyse bei 0, 10, 50 und 100 μE Insulin/ml graphisch dargestellt (n=10).

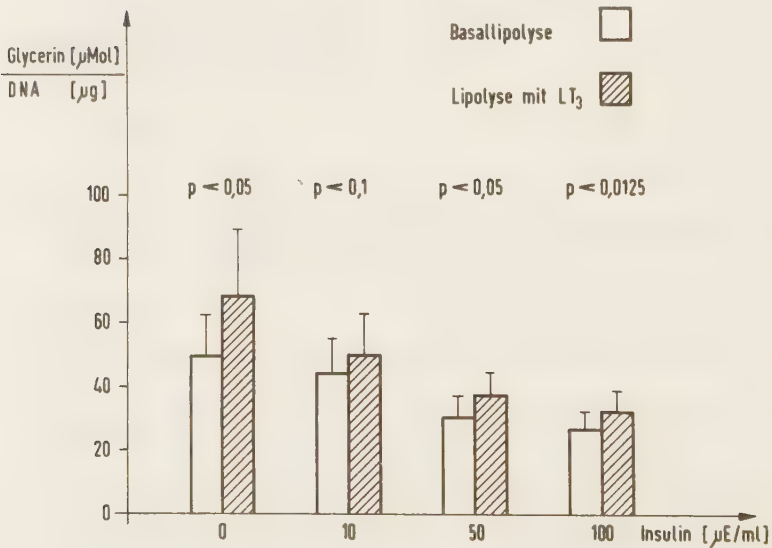


Abb. 2: Der Einfluß von $5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l LT_3 auf die Lipolyse isolierter Rattenfettzellen im Vergleich zu basalen Werten.

Es zeigte sich in jedem Fall eine Erhöhung der Glycerin-freisetzung unter dem Einfluß von LT_3 ; am deutlichsten ist dieser Effekt bei dem insulinfreien Ansatz zu erkennen. Die Konzentration des SDH betrug in allen Ansätzen $5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l.

Die gemessenen Glycerin konzentrationen mit Streubereich (SEM), den prozentualen Anstieg der Lipolyse unter LT_3 sowie die ermittelten Signifikanzen zeigt Tab. 1.

$G_{\text{Insulin}} (\mu E/ml)$	0	10	50	100
Basallipolyse	49,38	44,10	30,72	26,53
<u>$\pm$SEM</u>	<u>$\pm 13,08$</u>	<u>$\pm 11,39$</u>	<u>$\pm 5,79$</u>	<u>$\pm 4,72$</u>
LT_3 -Lipolyse	68,07	50,29	36,95	31,54
<u>$\pm$SEM</u>	<u>$\pm 21,26$</u>	<u>$\pm 13,60$</u>	<u>$\pm 7,40$</u>	<u>$\pm 6,29$</u>
%-Steigerung	37,8%	14,0%	20,3%	18,8%
Signifikanz	$p < 0,05$	$p < 0,1$	$p < 0,05$	$p < 0,0125$

Tab.1: Lipolyse basal und mit $5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l LT_3 (gemessen in μ Mol/Glycerin/ μ g DNS), prozentuale Steigerung durch LT_3 und deren Signifikanz

B) DT_3

Der Zusatz von $5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l DT_3 zum Inkubationsmedium be-

wirkte im Vergleich zur basalen Lipolyse keine Steigerung der Glycerinfreisetzung ($n=10$). Lediglich bei der höchsten Insulinkonzentration von $100 \mu\text{E/ml}$ liegt der Glycerinspiegel unter DT_3 mit $29 \mu\text{Mol}/\mu\text{g}$ DNS über dem basalen ($26,5 \mu\text{Mol}/\mu\text{g}$ DNS). In den Ansätzen mit $50 \mu\text{E}$ Insulin/ml wurden in beiden Fällen etwa die gleichen Glycerinkonzentrationen gemessen. Bei 0 und $10 \mu\text{E}$ Insulin/ml lag die Lipolyserate unter DT_3 sogar unter der basalen. Im t-Test für verbundene Stichproben konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Lipolyse der Fettzellen mit und ohne DT_3 festgestellt werden. (s. Abb. 3)

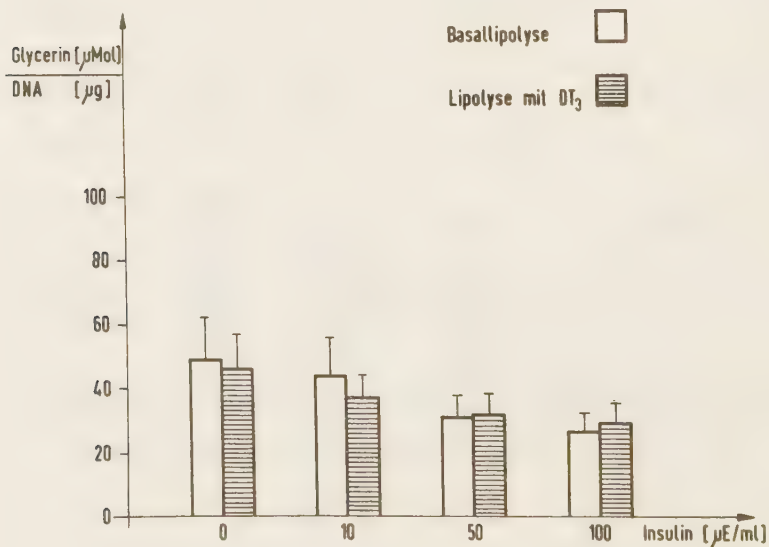


Abb. 3: Der Einfluß von $5 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/ml}$ DT_3 auf die Lipolyse isolierter Rattenfettzellen im Vergleich zur basalen Lipolyse

C) Adrenalin

Abb. 4 zeigt die Wirkung von Adrenalin in einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l auf die Lipolyse isolierter Rattenfettzellen.

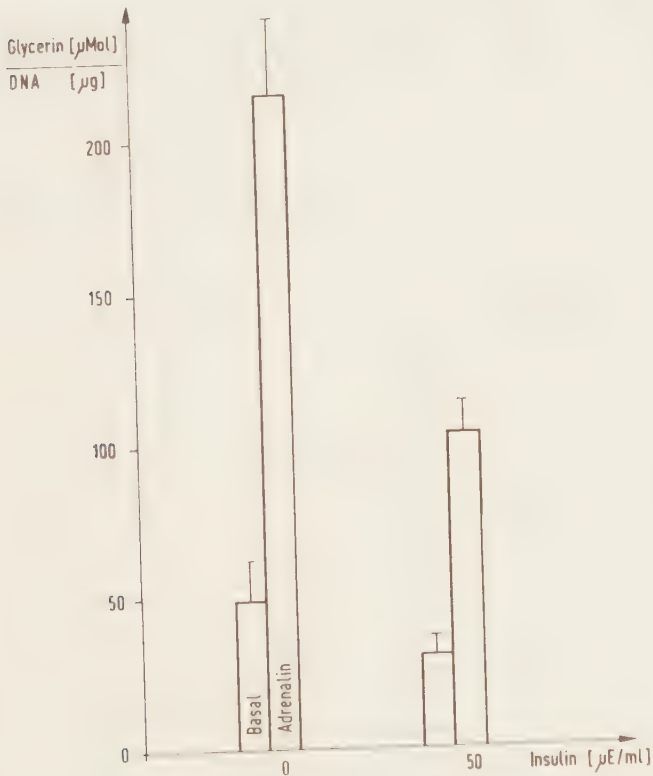


Abb.4: Der Einfluß von $4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l Adrenalin auf die Lipolyse isolierter Rattenfettzellen verglichen mit Kontrollwerten.

Bezogen auf 1 μg DNS/ml wurde von den Fettzellen unter Adrenalineinfluss etwas mehr als das Vierfache derjenigen Glycerinmenge freigesetzt, die wir als die basale Lipolyse bezeichneten. Da die Ansätze mit Adrenalin lediglich die metabolische Aktivität der Fettzellen nachweisen sollten, wurden sie nur bei zwei verschiedenen Insulinkonzentrationen (0 und 50 $\mu\text{E/ml}$) durchgeführt. Aus dieser Abbildung wird außerdem ersichtlich, daß der antilipolytische Effekt des Insulins bei der forcierten Lipolyse wesentlich ausgeprägter als bei der basalen in Erscheinung tritt. (n=10)

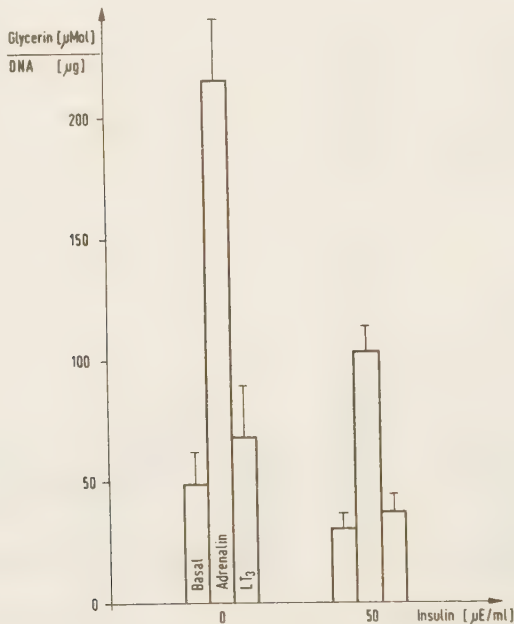


Abb. 5: Der Einfluß von $4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l Adrenalin bzw. $5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l LT_3 im Vergleich zur basallipolyse

Einen Vergleich der lipolytischen Wirkung von Adrenalin und LT_3 zeigt Abb. 5. Die prozentuale Steigerung im insulinfreien Medium beträgt für LT_3 37,8% und für Adrenalin 339% gegenüber der Basallipolyse. In Anwesenheit von $50 \mu E$ Insulin/ml steigert LT_3 die Lipolyse um 20,3%, Adrenalin um 235,5%. Auch im Rahmen unserer Untersuchungen hat sich Adrenalin als das am stärksten wirksame lipolytische Agens erwiesen.

D) LT_4 und DT_4

Der Einfluß von L- und D-Thyroxin auf die Lipolyse der isolierten Fettzellen wurde in vier Versuchen getestet. Die Mittelwerte der Meßergebnisse sind in Tab. 2 aufgetragen.

μE Insulin/ml	μMol Glycerin/ μg BNS		
	Basal	LT_4	DT_4
0	192,4	177,1	186,9
50	143,9	156,5	157,5

Tab. 2: Lipolyse unter LT_4 und DT_4 im Vergleich zur Basallipolyse

In der verwendeten Konzentration von $25 \cdot 10^{-6}$ Mol/l wurde weder bei dem physiologischen LT_4 noch bei DT_4 eine signifikante Steigerung des Fettabbaus im Vergleich zur Basallipolyse beobachtet.

III.3. Vergleich der Wirkung von LT_3 und DT_3

Da bei jedem der zehn Experimente die gleiche Fettzellpräparation sowohl mit LT_3 als auch mit DT_3 inkubiert wurde, ist es aufschlußreich, die Meßergebnisse bezüglich dieser beiden Bedingungen dem t-Test für verbundene Stichproben zu unterwerfen. Zur Verdeutlichung sind die Mittelwerte der Glycerinkonzentrationen ($\pm$ SEM) unter Einfluß von LT_3 und DT_3 in Abb. 6 noch einmal nebeneinander dargestellt.

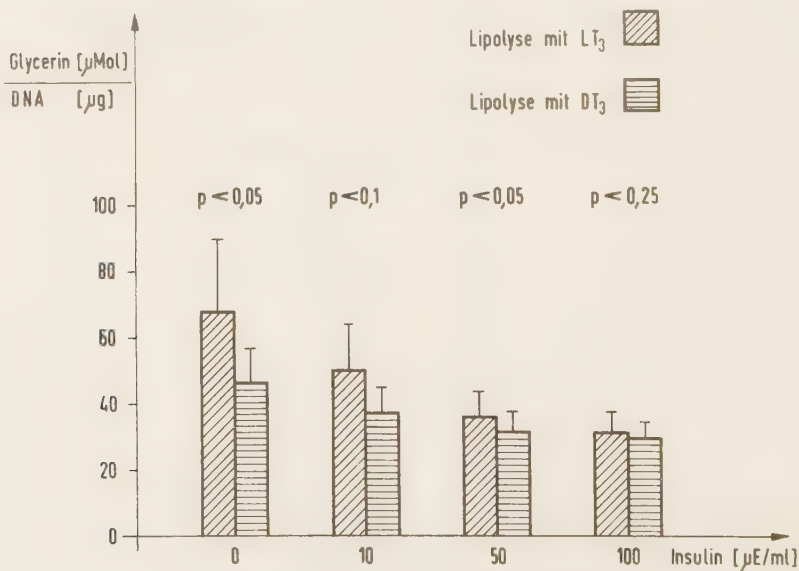


Abb. 6: Vergleich der Wirkungen von $5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l LT_3 und $5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l DT_3 auf die Lipolyse isol. Rattenfettzellen.

Hieraus wird ersichtlich, daß LT_3 im Vergleich zu DT_3 bei allen vier verwendeten Insulinkonzentrationen eine Steigerung der Lipolyse bewirkt. Bei 0 und $50 \mu E$ Insulin /ml ist dieser Unterschied schwach signifikant ($p < 0,05$), bei $10 \mu E/ml$ war $p < 0,1$. Keine Signifikanz zeigte die Differenz der Mittelwerte bei $100 \mu E/ml$.

III.4. Dosis - Wirkungskurven für LT_3 und Adrenalin

In drei Versuchen wurde die Wirkung unterschiedlicher Dosen von LT_3 und Adrenalin auf die Lipolyse der isolierten Rattenfettzellen untersucht. Die höchste Konzentration betrug bei beiden Hormonen 10^{-5} Mol/l. Davon ausgehend wurden weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:10 hergestellt bis zur niedrigsten Konzentration von 10^{-11} Mol/l.

LT_3 bewirkte in einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l eine Steigerung der Lipolyse auf das 3,7fache des basalen Wertes; mit 10^{-6} Mol/l wurde eine Erhöhung um 50% erzielt. Niedrigere Konzentrationen zeigten keinen Effekt auf den Fettabbau der Zellen mehr.

Mit 10^{-5} Mol/l Adrenalin im Inkubationsmedium wurde die Lipolyse maximal stimuliert; die pro g DNS freigesetzte Glycerinmenge war etwa $19 \text{ m}\mu$ so hoch wie die basale. In einer Konzentration von 10^{-6} Mol/l bewirkte Adrenalin eine Steigerung der Lipolyse um den Faktor 4, und bei

10^{-7} Mol/l war die Glycerinkonzentration im Inkubationsmedium um ein Viertel höher als im hormonfreien Ansatz. Die weiteren Verdünnungen bis 10^{-11} erbrachte auch bei Adrenalin keine meßbare Änderung gegenüber der Basallipolyse mehr. (s. Abb. 7)

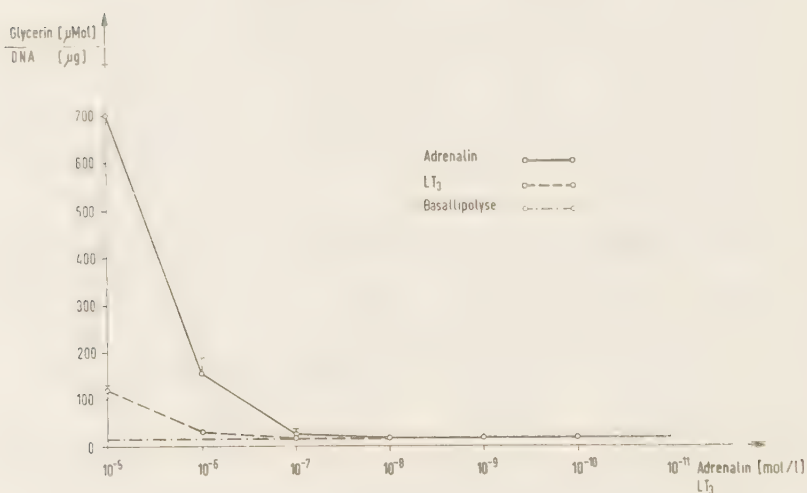


Abb.7: Dosiswirkungskurven von LT_3 und Adrenalin (10^{-5} bis 10^{-11} Mol/l in 10^{-1} Schritten) im Vergleich zur basalen Lipolyse

Die von uns verwendete Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ Mol T_3 /l kommt unter den vorhandenen Bedingungen, besonders unter

Berücksichtigung der Bindung von T_3 an Albumin, den physiologischen Verhältnissen am nächsten (CHALLONER, 1970).

III.5. Lipolyse isolierter Rattenfettzellen im Serum

Für diese Versuche wurden die Fettzellen in Serum anstelle von Albuminpuffer inkubiert. Wir testeten die Lipolyse im Serum von Normgewichtigen, Adipösen, die normale Kost zu sich nahmen, und fettsüchtigen Patienten während einer Nulldiät. In Tab. 3 sind die Insulinkonzentrationen aufgezeichnet, die aus den Seren der Versuchspersonen radioimmunologisch bestimmt wurden.

Vp.	Normalkollektiv	Adipositas	Nulldiät
1	41,2	35,0	8,6
2	10,1	21,6	15,6
3	8,8		12,6
4	7,6	27,0	9,7

Tab. 3: Insulinkonzentrationen ($\mu E/ml$) in den Seren der Versuchspersonen. Die angegebenen Werte wurden als Mittelwerte von Dreifachbestimmungen errechnet.

Abb. 8 zeigt die Ergebnisse unserer Versuche mit der In-

kubation isolierter Fettzellen im Serum.



Abb. 8: Lipolyse isolierter Rattenfettzellen im Serum von Normalgewichtigen, Adipösen und Nulldiätpatienten im Vergleich zur Lipolyse im Albuminpuffer. 1 und 2 mit $4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l Adrenalin, 3 und 4 ohne Adrenalin. Ansatz 1 und 3 im unverdünnten Serum, Ansatz 2 und 4: Serumverdünnung mit Albuminpuffer im Verhältnis 1:1. Basallipolyse:-----

Die Ansätze 1 und 2 enthielten $4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l Adrenalin. In

Ansatz 1 und 3 waren die Zellen im unverdünnten Serum inkubiert, und in Ansatz 2 und 4 wurde das Serum mit Albuminpuffer im Verhältnis 1:1 verdünnt. Am höchsten war die Lipolyserate der isolierten Fettzellen, welche im Serum von adipösen Patienten unter Nulldiät inkubiert waren. Die stärkste Hemmung der Glycerinfreisetzung bewirkte das Serum von normalessenden adipösen Versuchspersonen. Die Steigerung der Lipolyse im Nulldiätserum ist - verglichen mit dem Normalkollektiv - hochsignifikant (Student-t-Test für korrelierende Stichproben; Ansatz 1: $p < 0,0025$, Ansatz 2: $p < 0,005$). Der Vergleich zwischen Normalkollektiv und adipösen Versuchspersonen mit Normalkost brachte folgende Ergebnisse: Ansatz 1: keine signifikante Hemmung der Lipolyse gegenüber dem Normalkollektiv, Ansatz 2: $p < 0,025$.

IV. DISKUSSION

IV.1. Versuchsablauf

Die Durchführung der Versuche erfolgte nach der von KRICK (1973) beschriebenen Methode. Die Verwendung isolierter Fettzellen bietet gegenüber der Fat-pad-Methode die Vorteile gleichmäßiger Verteilung des Reaktionssubstrats im Inkubationsmedium, gleicher Diffusionsstrecken der im Medium enthaltenen Hormone zu allen Zellen und größerer Oberfläche. Außerdem wird bei dieser Methode ausschließlich der Stoffwechsel der Fettzellen erfaßt; störende Einflüsse von seiten des Bindegewebes fallen weg. So fanden GLIEMANN und VINTEN (1974), die beide Methoden bezüglich der Triglyceridbildung aus radioaktiv markierter Glucose verglichen, daß die Lipogenese isolierter Fettzellen im Mittel dreimal so hoch war, wie die oberflächlicher Fat-pad-Zellen.

Im Gegensatz zu KRICK, der die Stoffwechselleistung der Zellen auf deren Anzahl in den Ansätzen bezog, wählten wir die in 1 ml der Zellsuspension enthaltene DNS-Menge als Bezugsgröße. Die anfangs durchgeführte Zählung der Zellen war aufgrund der stark variierenden Zellgröße zu ungenau, und die Versuche untereinander somit kaum vergleichbar. Die Isolierung und Bestimmung der DNS nach den in Teil II angegebenen Methoden hingegen erbrachte

gut reproduzierbare Ergebnisse; es wurden grundsätzlich Doppel-, oft sogar Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Zur Überprüfung der Haltbarkeit der isolierten, mit konzentriertem Aethylalkohol, ausgefällten DNS wurden von vier Versuchen je zwei Proben sofort bestimmt und zwei andere aufgehoben. Die Bestimmung nach 10 bis 14 Tagen ergab gute Übereinstimmung mit den ersten Messungen.

Es wäre grundsätzlich auch möglich gewesen, unsere Versuche mit isolierten menschlichen Fettzellen durchzuführen. Vergleichende Untersuchungen von GALTON und BRAY (1967) sowie von BURNS und LANGLEY (1968) haben jedoch gezeigt, daß isolierte Fettzellen der Ratte wesentlich sensibler und beständiger auf hormonelle Einflüsse reagieren als die des Menschen. Darüber hinaus sind die Rattenfettzellen auch weniger empfindlich gegenüber mechanischen und chemischen Einwirkungen. Bei Verwendung von Tieren gleichen Stammes und gleicher Fütterung, die zum Zeitpunkt des Versuches auch nahezu gleiche Gewichte hatten, konnten wir störende Einflüsse von seiten der Zellgröße oder unterschiedlicher Stoffwechsellage (GRIES 1970) vermeiden. Obwohl Untersuchungsergebnisse, die an tierischem Material gewonnen werden, nicht ohne weiteres auf den menschlichen Organismus zu übertragen sind, sind unsere Befunde über den Einfluß von DT_3 auf die Lipolyse doch aussagekräftig, da sie im Vergleich zu den Wirkungen von LT_3 und Adrenalin gewonnen wurden.

IV.2. Die lipolytischen Hormone (Adrenalin und Trijodthyronin)

Es existiert eine Reihe von Hormonen, welche die Fettmobilisation beschleunigen. Außer den von uns verwendeten - Adrenalin und SDH - gehören dazu noch HGH, ACTH, Glucagon und LH. Obwohl diese Hormone unterschiedlichen chemischen Stoffklassen angehören, zeigen sie im Hinblick auf die Lipolyse alle die gleiche Wirkung, nämlich die Stimulation der Fettmobilisation. U. a. BUTCHER (1970) nahm an, daß verschiedene Adenylzyklase-Systeme mit spezifischer Hormon-Affinität durch Erhöhung der intrazellulären Konzentration an c-AMP die Lipolysesteigerung hervorrufen. Eine andere Annahme über den zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus stammt von JEANRENAUD et al. (1970). Diese Autoren fanden durch Untersuchungen an isolierten Rattenfettzellen, daß lipolytische Hormone die Aufnahme von α -Aminoisobuttersäure durch die Fettzelle, sowie deren Gehalt an ATP und Kaliumionen vermindern. Sie hielten es daher für denkbar, daß die Lipolyse aus Änderungen des Ionenflusses, eventuell sogar aus einer Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration resultiert. Da gezeigt wurde, daß solch eine Abnahme die Glucoseutilisation stimuliert, und die Aktivität der Adenylcyclase in Abwesenheit von Glucose sinkt, könnte dies per se den lipolytischen Prozess limitieren.

Adrenalin gilt als das am stärksten wirksame lipolytische Agens; deshalb verwendeten wir es zur Kontrolle der Stoffwechselaktivität der isolierten Fettzellen. Der Wirkungsmechanismus zur Stimulation der Lipolyse durch Adrenalin ist noch nicht restlos aufgeklärt, doch weisen viele Befunde darauf hin, daß Adrenalin durch Erhöhung der intrazellulären Konzentration an zyklischem AMP die Aktivität der Triglyceridlipase steigert (BUTCHER 1970, CHMELAR und CHMELAROVA 1973, MOSKOVITZ und FAIN 1969). Dieses zyklische Derivat des ATP gilt aufgrund seiner weitverbreiteten Wirkungen als "sekundärer Überträgerstoff", durch den eine große Anzahl chemischer Regulatoren der zellulären Aktivität ihre Effekte ausüben. Im Falle der Lipolyse aktiviert Adrenalin die Adenylzyklase; dies erhöht den intrazellulären c-AMP-Spiegel, was schließlich eine vermehrte Umwandlung der inaktiven Lipase in ihre aktive Form bewirkt. Eine weitere Wirkung von Adrenalin auf das Fettgewebe ist die von BRAY und GOODMAN (1968) beschriebene Erhöhung des Glucoseeinstroms in die Zelle. Sie fanden diese erhöhte Glucoseoxydation auch bei reduzierter oder völlig unterbundener Lipolyse. Dieser Effekt scheint also unabhängig von der Lipolyse zu sein. Die Lipolyse ihrerseits steht jedoch in engem Zusammenhang mit dem Glucoseangebot an die Fettzelle. EFENDIC und ÖSTMAN (1970) fanden eine Erhöhung der basalen und der stimulierten Glycerinfreisetzung durch Glucose, und eine Minderung des antilipolytischen

Effekts von Insulin durch Glucose und Fructose wurde von HALL und BALL (1970) beschrieben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß der Glucosestoffwechsel mit der Aktivität der Triglyceridlipase in enger Beziehung steht.

Adrenalin erhöht den Sauerstoffverbrauch von Fettzellen ebenso wie Trijodthyronin, letzteres in geringerem Ausmaß. Dieser Effekt ist durch Inhibition der oxydativen Phosphorylierung nicht hemmbar, entsteht also durch Oxydation nicht-phosphorylierender Substrate (CHALLONER, 1969, 1970).

Die lipolytische Antwort auf Adrenalin war bei unseren Versuchen wesentlich höher als die auf LT_3 . Dies stimmt überein mit Befunden von CHALLONER und ALLEN (1970) sowie HOFMANN et al. (1971). Die Wirkung von LT_3 beruht wahrscheinlich nicht auf einer direkten Interaktion mit dem Adenylzyklase-System. CHALLONER und ALLEN (1970) konnten zeigen, daß die Erhöhung des Adrenalineffekts auf Lipolyse, Anhäufung von zyklischem AMP und O_2 -Verbrauch mit LT_3 durch Blocker der Proteinsynthese nicht beeinträchtigt wurde. Sie beruht also nicht auf einer vermehrten Enzymsynthese. Es wurde vermutet, daß Trijodthyronin das Adenylzyklasesystem für die Wirkung anderer Hormone sensibilisiert. Untersuchungen von ROSENQUIST et al. (1971) am Fettgewebe eu- und hypothyreoter Vpn ergaben eine Senkung, bzw. völlige Aufhebung der Noradrenalin-induzierten Lipolyse bei Hypothyreose. Da die Wirkung anderer lipolytischer Sub-

stanzen am Fettgewebe hypothyreoter Patienten nicht beeinträchtigt war, ist das Lipase-System als limitierender Faktor auszuschließen. Weitere Versuche zeigten, daß die Hemmung der NA-induzierten Lipolyse durch das Vorhandensein der Hypothyreose allein ausgelöst wird. Sie war unabhängig von Alter und Gewicht der Patienten, sowie von Dauer und Stärke der Hypothyreose und konnte nach Beginn der Substitutionstherapie nicht mehr beobachtet werden. (ROSENQUIST, 1972 a). Da dieser Effekt der Hypothyreose auf die durch Noradrenalin hervorgerufene Lipolyse durch Zugabe von Phentolamin, eines α -adrenergen Antagonisten, aufgehoben wurde, nahm der Autor an, daß erhöhte α -adrenerge Stimulation dessen Ursache ist. Die Tatsache, daß α -adrenerge Stimulation in Anwesenheit eines β -Blockers zwar die theophyllininduzierte, nicht jedoch die durch DBcAMP hervorgerufene Lipolyse hemmt, weist darauf hin, daß α -adrenerge Stimulation möglicherweise die Synthese von cAMP vermindert. Die unterschiedliche Antwort des Fettgewebes eu- bzw. hypothyreoter Personen auf NA dürfte auf qualitativen Änderungen in der Balance zwischen α - und β -adrenergen Rezeptoren beruhen. (ROSENQUIST, 1972)

Die Schilddrüsenhormone beeinflussen nicht nur den Fettstoffwechsel in der Fettzelle, sie wirken auch auf die Serumkonzentrationen von Cholesterin und Triglyceriden sowie auf die Aktivität der Lipoproteinlipase. KIRKEBY (1968) fand sowohl bei Hypothyreose als auch bei Hyperthyreose niedrige Lipo-

protein-Lipase-Aktivität im Postheparin-Plasma, während die Konzentration der TG bei Hypothyreose hoch, bei Hyperthyreose jedoch erniedrigt war. Dieser widersprüchliche Befund könnte jedoch durch eine Beeinflussung von Synthese und Abbau der Lipoproteinlipase durch die SDH erklärt werden. NIKKILÄ und KEKKI (1972) beschrieben dagegen bei Hyperthyreose erhöhte Plasma-TG-Konzentrationen aufgrund vermehrter endogener TG-Produktion. Die Turnover-Rate endogener sowie exogen zugeführter TG war gegenüber euthyreoten Kontrollpatienten ebenfalls beschleunigt, die lipolytische Aktivität im Post-Heparin-Plasma erhöht. Bei Hypothyreose fanden sie eine normale Plasma-TG-Syntheserate; die erniedrigte PHLA führte jedoch zu Hypertriglyceridämie. Eine hochsignifikante Korrelation bestand zwischen PHLA und der Transportrate endogener TG sowohl bei Hyper- als auch bei Hypothyreose. Die SDH kontrollieren offensichtlich sowohl die Produktion als auch den Abbau von Plasma-TG, der Wirkungsmechanismus ist jedoch unbekannt.

IV.3. I n s u l i n u n d L i p o l y s e

Es gibt eine Reihe von Hormonen, welche fördernd auf die Lipolyse von Fettzellen einwirken, Insulin scheint jedoch das einzig wesentliche Hormon mit ausgeprägter antilipolytischer Wirkung zu sein. Entsprechend der Vorstellung, daß zyklisches AMP als Vermittler der Hormonwirkung agiert,

wurde bisher angenommen, daß Insulin die Synthese von cAMP verringert und möglicherweise dessen Abbau beschleunigt. Untersuchungen von KHOO et al. (1973), FAIN und ROSENBERG (1972) und SCHÖNHÖFER et al. (1972) zeigten jedoch, daß Insulin in antilipolytisch wirksamen Dosen keine Änderung der Aktivität von Adenylcyclase und Phosphodiesterase bewirkte. KHOO beobachtete einen Umbau der aktiven Lipase in ihre inaktive Form im Zusammenhang mit der antilipolytischen Wirkung des Insulins, doch wirkte Insulin nur schwach antagonistisch auf die durch Adrenalin hervorgerufene Erhöhung des cAMP-Spiegels. Diese Dissoziation zwischen dem Antagonismus von Adrenalin und Insulin auf die Enzymaktivität einerseits und die Konzentration von zyklischem AMP andererseits läßt es unwahrscheinlich erscheinen, daß die antilipolytische Wirkung von Insulin durch eine Verminderung der cAMP-Konzentration hervorgerufen wird.

LAVIS und WILLIAMS (1973) untersuchten den Einfluß hoher Dosen von Insulin auf die Lipolyse. Sie beschrieben ein Absinken der durch Adrenalin ($5,5 \mu\text{M}$) hervorgerufenen Glycerinfreisetzung bei einer Insulinkonzentration von 2 ng/ml . Die zwanzigfache Konzentration zeigte keine Beeinträchtigung der Lipolyse. Sie bewirkte vielmehr eine Verlängerung des durch Adrenalin erhöhten lipolytischen Prozesses. Ebensowenig fand CURTIS-PRIOR (1973) durch hochdosiertes Insulin eine Verminderung der seruminduzierten oder ba-

salen Lipolyse. KONC und BARHAM (1973) schließlich beobachteten, daß Insulin die Menge an cAMP in isolierten Rattenfettzellen und deren Lipolyserate sowohl erniedrigen als auch erhöhen kann. Diese Effekte waren abhängig von der Insulinkonzentration und der Art der verwendeten lipolytischen Agentien.

In den von uns gewählten Konzentrationen von 10, 50 und 100 μ E/ml zeigte Insulin eine ausgeprägte antilipolytische Wirkung. Der Effekt war am deutlichsten bei der Adrenalin-stimulierten Lipolyse; hier bewirkten 50 μ E Insulin/ml ein Absinken der Glycerinfreisetzung auf die Hälfte des basalen Werts. Die geringste Wirkung war auf die basale Lipolyse und die Lipolyse unter DT_3 zu sehen. Doch wurde auch hier das Absinken der Glycerinkonzentrationen mit steigenden Insulinkonzentrationen deutlich. (s. Abb. 2). Diese Befunde stimmen überein mit Veröffentlichungen von KNIGHT und ILIFFEE (1973), LISCH et al. (1971, 1973 und 1974) und GRIES; BERGER und OBERDISSE (1968). LISCH et al. betonen allerdings, daß Insulin nur die stimulierte Lipolyse hemmt, und keinen Einfluß auf die Basallipolyse zeigt. Da die Experimente dieser Autoren mit isolierten Fettzellen des Menschen durchgeführt wurden, läßt sich der von uns beobachtete antilipolytische Effekt des Insulins z. B. mit der höheren Sensitivität der Rattenfettzellen auf Hormone erklären. Die Anwesenheit von Glucose mildert konzentrationsabhän-

gig den antilipolytischen Effekt von Insulin (HALL und BALL, 1970). Dieser Effekt kommt jedoch erst bei höheren als den von uns verwendeten Glucosekonzentrationen zum Tragen.

IV. 4. V e r g l e i c h LT_3 - DT_3

Die Wirkungen von LT_3 auf Konzentration und Stoffwechsel der Serumlipide läßt sich aufgrund der vielfältigen Nebenwirkungen therapeutisch kaum ausnützen. Betrachtet man nun die Berichte über die Senkung der Lipidkonzentrationen im Serum durch DT_3 , so erscheint dieses Präparat alle Voraussetzungen zum Einsatz gegen primäre Hyperlipidämien zu erfüllen. BROWN, DOYLE und HESLIN (1962) erzielten in einer Dosierung von 1,5 - 2 mg DT_3 täglich eine effektive und anhaltende Senkung der Serumlipide (Cholesterin, Triglyceride und Phospholipide) bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Obwohl keine meßbaren calorigenen Effekte beobachtet wurden, erfuhren 40% der Patienten gehäufte und verstärkte Angina pectoris-Anfälle. DANOWSKI et al. (1971) fanden einen Abfall des Serumcholesterins von ca. 75 mg % bei normo- und hyperlipidämischen Personen durch $NaDT_3$. Die Dosierung betrug 1 mg/die und wurde 24 Wochen lang verabreicht. Darüber hinaus stellten sie ein Absinken des Serum- LT_4 bis zur Myxoedemgrenze fest. Da die Probanden klinisch euthyreot blieben, vermuteten sie,

daß NaDT_3 einen SDH-ähnlichen Effekt bewirkt. Nach Untersuchungen von KOSCHINSKY et al. (1974) konnte der Serumcholesterinspiegel bei Hyperlipoproteinämie vom Typ II a mit DT_3 (2 mg/die) um 20 - 25 % gesenkt werden. Kombination von DT_3 und DT_4 erbrachte - vor allem in höherer Dosierung - eine Cholesterinsenkung von 25 - 35 % aber auch cardiogene Nebenwirkungen. SCHWARZ und HUHNSTOCK (1964) beschrieben hingegen eine gute Verträglichkeit von DT_3 (1,5 - 2 mg täglich) ohne Nebenwirkungen. Sie behandelten 10 Patienten mit ausgeprägter essentieller Hyperlipidämie über durchschnittlich 14 Monate. Auch diese Autoren berichten über eine wesentliche Senkung der Lipid- und Lipoidkonzentrationen sowie über die Rückbildung schmerzhafter Hautxanthome und Gelenkschwellungen. Ähnliche Erfolge hatte MEYER (1970), der die früher beschriebenen Unverträglichkeitserscheinungen auf Verunreinigung der DT_3 -Präparate mit LT_3 zurückführt.

Aufgrund dieser Erfolgsberichte hielten wir es für denkbar, daß DT_3 in Analogie zu seiner lipidsenkenden Wirkung auch die lipolytischen Effekte des LT_3 nachahmt. Die Inkubation der Fettzellen mit DT_3 $5 \cdot 10^{-6}$ M brachte jedoch im Vergleich zur Basallipolyse keine Steigerung der Glycerinfreisetzung. Die gemessenen Glycerinkonzentrationen lagen im insulinfreien Medium und bei 10 μE Insulin sogar unter den Werten der Basallipolyse. Bei 50 μE war kein Unterschied festzustellen und bei 100 μE war die Fettfrei-

setzung unter Einfluß von DT_3 geringfügig höher als die basale. Von diesen Unterschieden war jedoch keiner signifikant. Der Vergleich der Wirkung von DT_3 mit derjenigen von LT_3 auf die Lipolyse erbrachte deutliche Unterschiede. Die Differenz der Mittelwerte der Glycerinkonzentrationen war signifikant auf dem Fünfprozentniveau für 0 und 50 μE Insulin/ml, schwach signifikant ($p < 0,1$) bei einer Insulinkonzentration von 10 μE /ml. Die Inkubation mit 100 μE Insulin zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen DT_3 und LT_3 bezüglich der lipolytischen Wirksamkeit.

Damit muß angenommen werden, daß DT_3 die Fähigkeit zur Steigerung der Lipolyse nicht besitzt, zumal wir auch bei Verwendung höherer Konzentrationen von DT_3 (bis 10^{-4} M) keine erhöhte Glycerinfreisetzung, verglichen mit der Basallipolyse, beobachten konnten.

Offensichtlich ist die lipolytische Wirkung der SDH stark abhängig von deren sterischer Konfiguration. Dies gilt sowohl für die Position des asymmetrischen C-Atoms, als auch für die Stellung der Jod-Atome beim Trijodthyronin.

CHALLONER (1969, 1970) untersuchte die Wirkung von 3, 3', 5', Trijodthyronin auf den O_2 -Verbrauch von Fettzellen, fand jedoch auch keinen Effekt.

IV. 5. S e r u m i n k u b a t i o n

Die Inkubation von isolierten Fettzellen im Serum sollte

die Relevanz unserer vorher durchgeführten Versuche auch unter physiologischen Bedingungen bestätigen. Vergleicht man die Seruminkubationen mit den zur Kontrolle in Albuminpuffer durchgeführten, so fällt auf, daß allein im Serum fastender adipöser Vpn in Anwesenheit von Adrenalin $4 \cdot 10^{-6}$ M die Lipolyse der Fettzellen diejenige im Albuminpuffer erreicht, bzw. im verdünnten Serum übertrifft.

RECANT et al. (1963) beschrieben einen im Serum von Diabetikern enthaltenen Faktor, der die Freisetzung von FFS aus Rattenfettgewebe förderte. Der Effekt war unabhängig von der Insulin- und der Glucosekonzentration. Dieser lipolytische Effekt des Serums von erwachsenen Diabetikern wurde auch von CURTIS-PRIOR (1972) beobachtet. CURTIS-PRIOR und HANLEY (1973) zeigten außerdem, daß die lipolytische Wirkung im Serum fastender Ratten höher war, als in dem von gefütterten Tieren. Dieser Effekt konnte durch Propranolol gehemmt werden, nicht jedoch von Insulin. Die Fähigkeit zur Steigerung der Lipolyse besitzt Plasma ebenso wie Serum. Da zur Auslösung der Lipolyse durch diese unbekannten Agentien Ca^{++} -Ionen benötigt werden, kann dieser Effekt nicht durch zirkulierende Katecholamine erklärt werden; diese stimulieren die Lipolyse auch im Ca^{++} -freien Medium (CURTIS-PRIOR, 1973).

Unsere Ergebnisse lassen sich auch nicht allein durch die unterschiedlichen Insulinkonzentrationen in den Seren der einzelnen Gruppen erklären. Wir fanden zwar die stärkste

Lipolyse bei der Gruppe mit den niedrigsten Insulinkonzentrationen und umgekehrt, doch übertrifft die Lipolyse im Serum von Nulldiät-Patienten, das im Mittel $9,1 \mu\text{E}$ Insulin/ml enthielt, diejenige im insulinfreien Albuminpuffer um 30%. Möglicherweise wurde diese Steigerung durch eine Sensibilisierung des Adenylzyklase-Systems durch die im Serum enthaltenen SDH hervorgerufen. Dagegen spricht die signifikant niedrigere Lipolyse im Serum des Normalkollektivs. Hier war der Insulingehalt im Durchschnitt $16,9 \mu\text{E/ml}$. Die SDH-Konzentrationen wurden nicht gemessen, aber alle 4 Vpn waren klinisch euthyreot. Es ist also wahrscheinlich, daß die Stimulation der Lipolyse im Serum der fastenden Vpn durch einen ähnlichen Mechanismus entstand, wie er von den oben zitierten Autoren beschrieben wurde.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Gegensatz zu L-Trijodthyronin bewirkte das rechtsdrehende T_3 in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l keine Steigerung der Lipolyse. Der Befund war unabhängig von der Insulinkonzentration im Inkubationsmedium.
2. $25 \cdot 10^{-6}$ Mol/l DT_4 zeigten ebenso wie die gleiche Konzentration an LT_4 keinen Einfluß auf die Lipolyse isolierter Rattenfettzellen.
3. Die Inkubation isolierter Fettzellen im menschlichen Serum erbrachte eine hochsignifikante Steigerung der Lipolyse im Serum fastender Adipöser gegenüber dem von Normalgewichtigen, sowie schwach signifikante Hemmung der Lipolyse im Serum von normal essenden Adipösen im Vergleich zu dem normalgewichtiger Kontrollpersonen.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) BRAY, G. A., Goodman, H.M.: Effects of Epinephrine
on Glucose Transport and Metabolism in
Adipose Tissue of Normal and Hypothyroid
Rats.
J. Lipid Research 9, Nov. 1968, 714
- (2) BROWN, D. F., Doyle, J. T., Heslin, A. S.: Dextro 3:5:3'
Triiodothyronine Effect on Serum Lipid
Levels of Patients with Ischaemic Heart
Disease.
JAMA Vol 180 Nr. 8, May 26 (1962), 643
- (3) BURNS, F.W., Langley, P.: Observations on Lipolysis
with Isolated Adipose Tissue Cells.
J Lab Clin Med, 72, Nov 1968, 813
- (4) BUTCHER, R.W.: The Role of Cyclic AMP in the Actions
of some Lipolytic and Anti-Lipolytic Agents.
Horm Metab Res, 2, 1970, Suppl 2: 5
- (5) CERIOTTI, G.: A Microchemical Determination of Desoxy-
ribonucleic Acid.
J. Biol. Chem. 198, 1952, 297

- (6) CHALLONER, D. R.: A Direct Effect of Triiodthyronine on the Oxygen Consumption of Rat Fat Cells.
Am. J. of Physiol. 216, 1969, 905
- (7) CHALLONER, D. R.: Control of Respiration in Intact Tissues and the Effects of Triiodthyronine and Epinephrine on Fat Cells.
Horm Metab Res, 2, 1970, Suppl 2: 80
- (8) CHALLONER, D. R., Allen, D. O.: An in Vitro Effect of Triiodthyronine on Lipolysis, Cyclic AMP-C¹⁴ Accumulation and Oxygen Consumption in Isolated Fat Cells.
Metabolism, 19, 1970 a, 480
- (9) CHMELAR, M., Chmelarova, M.: Stimulation of Adipose Tissue Triglyceride Lipase Activity after in Vivo Administration of Dibutylryl Cyclic AMP or Norepinephrine.
Febs. Lett. 37, 1 Dec. 73, 264
- (10) CURTIS-PRIOR, P. B.: Studies on the action of high doses of Insulin and Anti-Insulin Serum (A/S) on basal and Serum-induced Lipolysis in the isolated Fat Cell.
Horm. Metab. Res. 5, Nov. 1973, 432

- (11) CURTIS-PRIOR, P. B., Hanley, T.: A fat- mobilizing factor in serum.
Acta endocr, 74, 1973, 409
- (12) CURTIS-PRIOR, P. B.: Lipolytic effects of serum and plasma on isolated fat cells of the rat in vitro.
Diabetologia, 9, 1973, 158
- (13) DANOWSKI, T. S. et al.: Hypolipidemic and thyroid hormone effects of sodium dextrotriiodothyronine.
Clin. Pharm. Ther. 12,1, 1971 126
- (14) DISCHE, Z.: Color Reactions of Nucleic Acid Components. The Nucleic Acids Vol.I, 1955, 285
Academic Press Inc.
- (15) EFENDIC, S., Östman, J.: Catecholamines and Metabolism of Human Adipose Tissue.
Acta med. scand., 187, 1970, 485
- (16) FAIN, J.N., Rosenberg, L.: Antilipolytic Action of Insulin on Fat Cells.
Diabetes, 21, 1972, Suppl 2: 414

- (17) GALTON, D. J., Bray, G. A.: Studies on Lipolysis in
Human Adipose Cells.
J Clin Invest, 46, April 1967, 621
- (18) GLIEMANN, J., Vinten, J.: Lipogenesis and Insulin Sen-
sitivity of Single Fat Cells.
J. Physiol. (Lond.), 236, Feb. 1974, 499
- (19) GRIES, F. A.: Hormonal Control of Human Adipose Tissue
Metabolism in vitro.
Horm Metab Res, 2, 1970, Suppl 2: 167
- (20) GRIES, F. A., Berger, M., Oberdisse, K.: Untersuchungen
zum Antilipolytischen Effekt des Insulins
am menschlichen Fettgewebe in vitro.
Diabetologia, 4, Nov. 1968, 262
- (21) HALES, C. N., Randle, P. J.,
Biochem. J. 88, 1963, 137
- (22) HALL, C. L., Ball, E. G.: Factors affecting Lipolysis
Rates in Rat Adipose Tissue.
Biochem. Biophys. Acta, 210, 14. Juli 70, 209

- (23) HOFMANN, G. G., et al.: Der Einfluß des L-Trijodthyronins auf den Glucoseumsatz und die Lipolyse isolierter Fettzellen der Ratte. *Verh. dt. Ges. inn. Med.*, 77, 1971, 660
- (24) HOLLINGSWORTH, D. R., Amatruda, T. T., Scheig, R.: Quantitative and qualitative effects of Triiodothyronine in massive obesity. *Metabolism* 19, 1970, 934
- (25) JEANRENAUD, B., Hepp, D., Renold, A. E.: The Influence of Lipolysis on Energy Metabolism of Isolated Fat Cells. *Horm Metab Res*, 2, 1970, Suppl 2: 76
- (26) KHOO, J. U. et al.: Hormonal Regulation of Adipocyte Enzymes. The Effects of Epinephrine and Insulin on the Control of Lipase, Phosphorylase, Kinase, Phosphorylase- and Glycogen-Synthetase. *J. Biol. Chem.*, 248, 10. Juni 73, 3823
- (27) KIRKEBY, K.: Post Heparin Plasma Lipoprotein Lipase Activity in Thyroid Disease. *Acta endocrinol.*, 59, 1968, 555

- (28) KNIGHT, Bl., Iliffe, J.: The Effect of Glucose, Insulin and Noradrenaline on Lipolysis, and on the Concentrations of Adenosine 3'-5'-Cyclic Monophosphate and Adenosine 5'-Triphosphate in Adipose Tissue.
Biochem. J., 132, Jan. 1973, 77
- (29) KONO, T., Barham, F. W.: Effects of Insulin on the Levels of Adenosine 3'-5'- Monophosphate and Lipolysis in Isolated Rat Epididymal Fat Cells.
J Biol Chem, 248, Nov. 10, 1973, 7417
- (30) KOSCHINSKY, T. et al.: Serumlipidsenkende Wirkung von DL-3,5-Diiodo-L-thyronin-methyläther, DT₄, DT₃ und einer Kombination von DT₄ und DT₃ bei primärer Hyperlipoproteinämie Typ II a und b
Vortrag anlässlich der 80. Tagung der Dt. Ges. f. innere Medizin, Wiesbaden 1974
- (31) KREUTZ, F. H.: Enzymatische Glycerinbestimmung.
Klinische Wochenschrift Jg.40, 1. April 1962, 362
- (32) KRICK, L. O.: Der Einfluß der Schilddrüsenhormone, des Adrenalins, Wachstumshormons und Dexamethasons auf den Kohlenhydrat- und Fettstoff-

wechsel isolierter Rattenfettzellen.

Dissertation 1973

- (33) LAVIS, Vr., Williams, R.H.: Lipolytic Effects of high Concentrations of Insulin on isolated Fat Cells. Enhancement of the Response to lipolytic Hormones.
Diabetes, 22, Aug. 1973, 629
- (34) LISCH, H. J. et al.: Effekt von Insulin und Glukose auf die Lipolyse und die Reveresterung von freien Fettsäuren in isolierten Fettzellen des Menschen.
Wien. 2. inn. Med. 52, 1971, 15
- (35) LISCH, H. J., et al.: Action of Insulin and Glucose on the Reesterification Rate of Free Fatta Acids in Isolated Human Fat Cells.
Diabetologia, 9, Dec. 73, 499
- (36) LISCH, H. J. et al.: The Action of Insulin and Glucose on Lipolysis in Isolated Human Fat Cells.
Horm. Metab. Res., 6, Jan 74, 25
- (37) MARMUR, J.: A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-organisms.
J. Mol. Biol. 3, 1961, 208

- (38) MARMUR, J.: A Procedure for the Isolation of Deoxy-
ribonucleic Acid from Microorganisms.
Methods in Enzymology, Vol VI, 1963, 726
Academic Press
- (39) MEYER, H. J.: D-Trijodthyronin in der Hyperlipidämie-
therapie.
Verh. d. dt. Ges. f. innere Medizin, 76.
Kongress 1970
- (40) MOSKOVITZ, J., Fain, J. N.: Hormonal Regulation of Lipo-
lysis and Phosphorylase Activity in Human
Fat Cells.
J Clin Invest, 48, Oct. 1969, 1802
- (41) NIKKILÄ, E. A., Kekki, M.: Plasma Triglyceride Metabo-
lism in Thyroid Disease.
J. Clin. Invest., 51, 1972, 2103
- (42) RECANT, L. et al.: Non-esterified fatty acid releasing
activity of diabetic serum.
Lancet II, 1963, 614
- (43) RODBELL, M.: The Metabolism of Isolated Fat Cells.
Handbook of Physiology, 1964, 471

- (44) ROSENQUIST, U. et al.: Influence of the Hypothyroid State on Lipolysis in Human Adipose Tissue in Vitro.
Acta med. scand., 189, 1971, 381
- (45) ROSENQUIST, U.: Noradrenaline-induced Lipolysis in Subcutaneous Adipose Tissue from Hypothyroid Subjects.
Acta med. scand., 192, 1972 a, 361
- (46) ROSENQUIST, U.: Inhibition of Noradrenaline-induced Lipolysis in Hypothyroid Subjects by Increased -Adrenergic Responsiveness.
Acta med. scand., 192, 1972, 353
- (47) SCHOENHOEFER, P. S., Skidmore, I. F., Krishna, G.: Effects of Insulin on the Lipolytic System of Rat Fat Cells.
Horm Metab Res, 4, Nov. 1972, 447
- (48) SCHWARZ, G., Huhnstock, K.: Die Behandlung von Hyperlipidämien und Hypercholesterinämien mit D-Trijodthyronin.
Dtsch. med. Wschr., 89, Nr. 35, 1964, 1635

Ich, Mechtild Hegnauer, wurde am 9. Mai 1950 als vierte von fünf Töchtern des Gymnasialprofessors Harald Hegnauer und seiner Ehefrau Dr. Margaretha, geb. Mender, geboren. Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in München. 1960 trat ich in das humanistische Gymnasium der Armen Schulschwestern am Anger über, wo ich 1969 die Reifeprüfung ablegte. Im Oktober 1969 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Münchener Ludwig-Maximilians-Universität. Dort bestand ich im Oktober 1970 die naturwissenschaftliche und im April 1972 die ärztliche Vorprüfung.

Herrn Prof. Dr. Kurt SCHWARZ danke ich für die Überlassung des Themas. Besonders dankbar bin ich Herrn Dr. G. G. HOFMANN für seine Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Nicht zuletzt bedanke ich mich auch bei Frau H. OBERNDORFER für die Anfertigung der Zeichnungen und Fräulein F. HAAG für die Herstellung der Abbildungen.

